

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	
International application No. PCT/DE00/02755	Applicant's or agent's file reference E01/1127/WO
International filing date (day/month/year) 10 August 2000 (10.08.00)	Priority date (day/month/year) 12 August 1999 (12.08.99)
Applicant BERLIN, Kurt	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 March 2001 (09.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer H. Zhou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 30 JUL 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

15 T



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1127/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02755	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07H19/06		
Anmelder EPIGENOMICS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.07.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Krattinger, B Tel. Nr. +49 89 2399 8550 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-8 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02755

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen;

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	- -
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 94 10128 A in der Anmeldung erwähnt

D2: NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 17, 1998, Seiten 1987-1996, in der Anmeldung erwähnt

Die Anmeldung betrifft mit 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl geschützte Nucleosidderivate (Ansprüche 1-5), Verfahren für ihre Herstellung (Anspruch 6), ihre Verwendung (Anspruch 7) und ein Kit, das das Derivat umfaßt (Anspruch 8).

Die Nucleoside von D1 werden mit 2-(o-Nitrophenyl)methoxy oder 2-(o-Nitrophenyl)methoxythiocarbonyl-Gruppen geschützt; die Nucleoside von D2 werden mit 2-(o-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Gruppen geschützt. Die Derivate der gegenwärtigen Anmeldung werden jedoch mit 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl-Gruppen geschützt.

Demzufolge enthalten die Dokumente D1-D2 keine technische Lehre, die dem Gegenstand der Ansprüche der Gegenwärtigen Anmeldung neuheitschädlich entgegensteht. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-8 neu (Art. 33(2) PCT).

Die Mechanismus der Photoabspaltung einer 2-(o-Nitrophenyl)methoxythiocarbonyl-Gruppe wie im Dokument D1 und der Photoabspaltung einer 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl wie in der Anmeldung müssen aufgrund der Anwesenheit eines zusätzlichen Kohlenstoffatoms in der schützenden Kette notwendigerweise unterschiedlich sein.

Außerdem ist ein Schwefel-Atom größer und weniger elektronegativer als ein Sauerstoff-Atom und die π -C=S Bindungen (2p-3p) sind weniger stabil als die C=O Bindungen (2p-2p). Deswegen ist die Reaktivität der 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl-Gruppe anders als die Reaktivität der Ethoxycarbonyl-Gruppe von D2.

Demzufolge ist es nicht offensichtlich 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl-Gruppen als photolabile Schutzgruppen für Nucleoside zu verwenden. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-8 erfinderisch (Art. 33(3) PCT).

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference E01/1127/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/02755	International filing date (<i>day month year</i>) 10 August 2000 (10.08.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 12 August 1999 (12.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 19/06		
Applicant EPIGENOMICS AG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 09 March 2001 (09.03.01)	Date of completion of this report 26 July 2001 (26.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/02755

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-10 . as originally filed
 pages _____ . filed with the demand
 pages _____ . filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 1-8 . as originally filed
 pages _____ . as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____ . filed with the demand
 pages _____ . filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1/1 . as originally filed
 pages _____ . filed with the demand
 pages _____ . filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____ . as originally filed
 pages _____ . filed with the demand
 pages _____ . filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-94/10128 (cited in the application)

D2: NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES, Vol. 17, 1998, pages
1987-1996 (cited in the application)

The application concerns 2-(o-nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl-protected nucleoside derivatives (Claims 1-5), a method for preparing such a derivative (Claim 6), the use of such a derivative (Claim 7) and a kit containing the derivative (Claim 8).

The nucleosides described in document D1 are protected by 2-(o-nitrophenyl)methoxy or 2-(o-nitrophenyl)methoxythiocarbonyl groups, and the nucleosides described in document D2 are protected by 2-(o-nitrophenyl)ethoxycarbonyl groups. The derivatives according to the present application are protected by 2-(o-nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl groups.

Thus the technical teachings of D1 and D2 are not prejudicial to the novelty of the subject matter claimed in the present application. The subject matter of Claims 1-8 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The mechanism for the photoremoval of a 2-(o-nitrophenyl) methoxythiocarbonyl group as per D1 and the photoremoval of a 2-(o-nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl group as per the present application are different on account of the presence of a additional carbon atom in the chain which is to be protected.

Moreover, a sulphur atom is larger and less electronegative than an oxygen atom, and the π -C=S bonds (2p-3p) are not as stable as the C=O bonds (2p-2p). Consequently the reactivity of the 2-(o-nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl group cannot be the same as that of the ethoxycarbonyl group in D2.

It is therefore not obvious that it is possible to use 2-(o-nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl groups as photolabile protecting groups for nucleosides. The subject matter of Claims 1-8 is therefore inventive (PCT Article 33(3)).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1127/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02755	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 12/08/1999
Anmelder EPIGENOMICS AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07H19/06 C07H19/10 C07H19/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A ✓	WO 94 10128 A (AFFYMAX TECH NV ;HOLMES CHRISTOPHER P (US); SOLAS DENNIS W (US); K) 11. Mai 1994 (1994-05-11) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6,7
A ✓	H. GIEGRICH ET AL.: "New photolabile protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry - synthesis, cleavage mechanisms and applications" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 17, 1998, Seiten 1987-1996, XP002161670 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6,7



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

de Nooy, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/02755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410128 A	11-05-1994	AU 5449094 A	24-05-1994

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

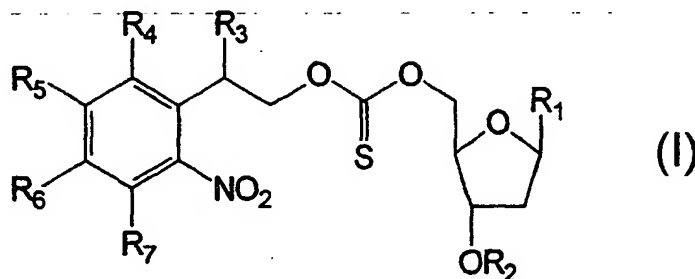
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/12642 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 19/06, 19/10, 19/16 (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02755 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 2000 (10.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 38 092.9 12. August 1999 (12.08.1999) DE (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, D-14532 Stahnsdorf (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES AND A METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) Bezeichnung: NUCLEOSIDDERIVATE UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG



(57) Abstract: Disclosed are novel nucleoside derivatives of general formula (I), wherein R₁ represents a nucleobase or a nucleobase that is provided with at least one protective group, R₂ means an H atom or a diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl group, R₃ is an H atom or an alkyl radical with up to 4 C atoms, R₄ represents an H atom, a nitro group or an alkyl radical with up to 4 C atoms, R₅ and R₆, independently from each other, mean an H atom, an alkyl radical with up to 4 C atoms or an alkoxy radical with up to 4 C atoms or together represent a methylenedioxy group and R₇ is an H atom or an alkyl radical with up to 4 C atoms. The novel nucleoside derivatives can easily be split by means of UV light and are used for the synthesis of oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden neue Nucleosidderivate der allgemeinen Formel (I), worin R₁ eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt, R₂ ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe bedeutet, R₃ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist, R₄ ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt, R₅ und R₆ unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylenedioxygruppe darstellen und R₇ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist. Die neuen Nucleosidderivate lassen sich mittels UV-Licht leicht spalten und werden für die Synthese von Oligonucleotiden verwendet.

WO 01/12642 A2



Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Nucleosidderivate und Verfahren zu deren Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleosidderivate
5 sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Photolabile Schutzgruppen wurden vor allem für die
Synthese von Oligomeren bereits vielfach beschrieben.
Besonders populär ist ihr Einsatz für die Synthese von
10 Peptiden und im Gebiet der kombinatorischen organischen
Synthese. Die Photolyse der Schutzgruppen ist eine
vergleichsweise milde Alternative zur traditionellen
basischen oder sauren Entschützung und ist deshalb vor
allem auch für die Synthese empfindlicher Biomoleküle
15 besonders geeignet. In diesem Zusammenhang wurden vor
allem zahlreiche Derivate mit ortho-Nitro-benzyl-
Funktionen erfolgreich eingesetzt, so auch für die
Synthese von Oligonukleotiden z. B. auf Oberflächen zur
Herstellung von Oligonukleotid Arrays (sogenannte
20 Biochips). Photospaltbare Schutzgruppen sollten zudem
stabil gegenüber basischen und sauren Reagenzien sein,
die in einer mehrstufigen Synthese zur Anwendung kommen,
und vor allem keine hochreaktiven Nebenprodukte bilden.

25 Zur Synthese von Oligonukleotiden unter Verwendung
photolabiler Schutzgruppen wurden bislang fast
ausschließlich Nucleosidderivate verwendet, die an der
5'-Position mit einer derivatisierten o-
Nitrobenzyloxycarbonyl oder einer 2-(o-
30 Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Funktion geschützt waren.
Diese lassen sich beispielsweise durch Bestrahlung mit
einer Hg-Lampe effektiv abspalten, wobei die
Emissionslinie bei 313 nm entscheidend ist. Bekannt sind
beispielsweise für die kommerzielle Synthese von Oligomer
35 Arrays ebenfalls o-Nitrobenzyloxycarbonyl-geschützte
Nucleosidderivate. Nucleosidbausteine mit photolabilen

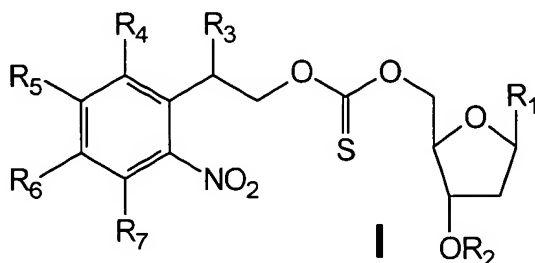
Schutzgruppen des 2-(o-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Typs sind gleichfalls bekannt. Die beschriebenen Schutzgruppen benötigen jedoch für eine vollständige Abspaltung vom Nukleosidbaustein noch immer relativ lange, meist werden
5 Bestahlungszeiten von einigen Minuten benötigt, wobei bei empfindlichen Biomolekülen wie DNA auch mit Nebenreaktionen gerechnet werden muss.

Giegrich, H. et al. (Nucleosides & Nucleotides 17 (1998),
10 s. 1987-1996) beschreiben die erwähnten photolabilen Schutzgruppen des 2-(o-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Typs. Es wird jedoch kein Hinweis darauf gegeben, dass anstelle der Carbonyl-Funktion auch eine Thiocarbonyl-Funktion verwendet werden kann.

15 In der WO-A-94/10128 werden photoreaktive Schutzgruppen beschrieben, welche vom 2-(o-Nitrophenyl)methoxy-Typ sind. Diese Verbindungen können dann u. a. auch Thiocarbonyl-Funktionen enthalten. Die allgemeine Formel
20 umfasst jedoch keine Verbindungen des 2-(o-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl-Typs.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher Nucleosidderivate zur Verfügung zu stellen, welche sich
25 leicht photolysieren lassen.

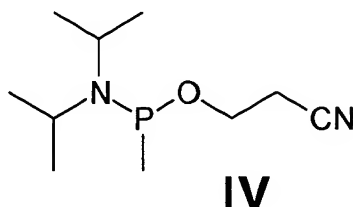
Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass Nucleosidderivate der allgemeinen Formel I geschaffen werden,
30



worin

R₁ eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,

R₂ ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-
 5 phosphinyl-Gruppe der Formel IV



bedeutet,

R₃ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen
 10 ist,

R₄ ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,

R₅ und R₆ unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit
 15 bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen und

R₇ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist.

20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass R₁ Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil oder Hypoxanthin ist, welche gegebenenfalls eine Schutzgruppe tragen.

25 Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass R₃ ein H-Atom, eine Methyl- oder eine Ethylgruppe ist.

Es ist ferner bevorzugt, dass

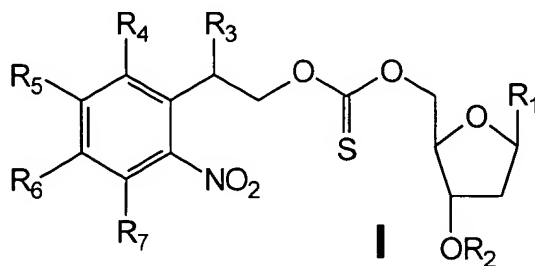
R₄ ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder eine Methylgruppe
 30 ist.

Weiterhin ist bevorzugt, dass

R_5 und R_6 unabhängig voneinander ein H-Atom oder eine Methyl-, Ethyl-, Methoxy- oder Ethoxygruppe darstellen oder zusammen eine Methylendioxygruppe bilden.

5

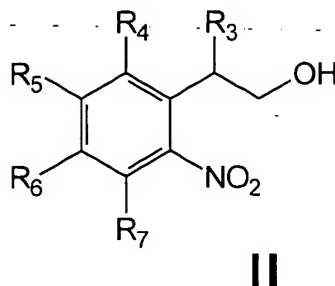
Ein weitere Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Nucleosidderivats der allgemeinen Formel I



10

worin die Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 die oben angegebene Bedeutung haben, wobei man in an sich bekannter Weise eine Verbindung der allgemeinen Formel II

15

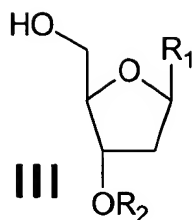


worin die Reste R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 die oben angegebene Bedeutung haben,

mit Thiophosgen umgesetzt und die so erhaltenen

20

Thiocarbonylchloride mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



worin die Reste R_1 und R_2 die oben angegebene Bedeutung haben,
umsetzt.

5

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen neuen Typ von photolabilen Schutzgruppen an Nukleosidderivaten (allgemeine Formel I), die sich sehr effizient abspalten lassen.

10

Die Thiokohlensäureester entsprechend der Formel I lassen sich analog zu den Kohlensäureestern in zwei Schritten herstellen. Zunächst wird ein Nitrobenzylalkohol- oder ein 2-Phenylethanol-derivat mit Thiophosgen zum entsprechenden Thiocarbonylchlorid umgesetzt und anschließend mit dem jeweiligen Nukleosidbaustein gekoppelt. Dabei nehmen Nukleobase und Schutzgruppen des Nukleosidbausteins auf die Synthese wenig Einfluß. Nach dem Anbringen der photolabilen Schutzgruppe kann der Nukleosidbaustein in sein Phosphoramidit überführt werden, so dass er der etablierten Amidit-Chemie, wie sie auch auf kommerziellen DNA-Synthesizern stattfindet, zugänglich ist. Die Abspaltung der Schutzgruppen der Nukleosidderivate nach Formel I erfolgt mittels Bestahlung mit einer Hg-Hochdrucklampe.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleosidderivate zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden. Hierbei werden an sich bekannte Syntheseautomaten und/oder Pipettierroboter verwendet, um die gewünschten Oligonucleotide aufzubauen.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Kit zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes

5 Nucleosidderivat, gegebenenfalls zusammen mit weiteren erfindungsgemäßen oder bereits bekannten Nucleosidderivaten und Reagenz- und Hilfsstoffen sowie Lösemitteln und einer Arbeitsanweisung. Die Arbeitsanweisung kann dabei auch in Form eines

10 Computerprogramms zur Programmierung des automatischen Ablaufs der einzelnen Syntheseschritte vorliegen. Mittels dieses Kits lassen sich die gewünschten Oligonucleotide leicht mittels automatisch arbeitender Vorrichtungen herstellen.

15

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1:

(5'-(2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxythiocarbonyl)thymidin)

20

a) Darstellung von 2-(2,6-Dinitrophenyl)-1-ethanol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 18.2g

Dinitrotoluol in 50ml absolutem DMSO vorgelegt und langsam mit einer Lösung von 1.8g Kalium-tert.-butylat in

25 20ml t-Butanol versetzt. Die anfangs leicht gelbliche Lösung färbt sich dabei intensiv violett. Das Reaktionsgemisch wird zunächst bei Raumtemperatur 5 Minuten und anschließend bei 70°C für 10 Minuten gerührt. Man lässt abkühlen und rührt über Nacht bei

30 Raumtemperatur weiter. Zur Aufarbeitung neutralisiert man mit konzentrierter HCl und fügt 300ml Aqua dest. hinzu. Zu der Lösung wird solange NaCl gegeben, bis die Lösung gesättigt ist. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige mehrmals mit EtOAc nachextrahiert. Die

35 vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Trockenmittel abfiltriert und das

Lösungsmittel abgezogen worden ist, wird der Rückstand in etwas heißem EtOAc aufgenommen, mit 100ml Petrolether überschichtet und zum Auskristallisieren über Nacht in den Tiefkühlschrank gestellt. Der Petrolether wird
5 abdekantiert, der Rückstand mit wenigen Tropfen Toluol verdünnt und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Als Laufmittel dient Toluol/EtOAc (5:1), die Polarität des Laufmittels kann bei nicht ausreichender Trennleistung während der Eluierung auf bis zu 3:1 gesteigert werden.
10 Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel abdestilliert. Die Reaktion ergab das reine Produkt in einer Ausbeute von 10.6g (50%). Rf-Wert (Silica60, Laufmittel Toluol/EtOAc 8:1) = 0,36

15 b) Darstellung von 2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxythiocarbonylchlorid

In einem ausgeheizten, mit Argon befluteten und mit einem Septum versehenen Rundkolben werden 400µl Thiophosgen in 2.5ml absolutem THF vorgelegt, auf 0°C gekühlt und
20 langsam mit einer Lösung von 1g 2-(2,6-Dinitrophenyl)ethanol in 7.5ml absolutem THF versetzt. Man lässt 20 Minuten unter Eiskühlung und anschließend 13/4h bei Raumtemperatur rühren und zieht ein Kontroll-DC (Laufmittel: Chloroform). Die trübe Lösung wird über
25 Celite abfiltriert und der Filterkuchen nochmals mit THF nachgewaschen. Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, bleibt ein tiefbrauner öliger Rückstand, der im Vakuum weiter getrocknet wird und direkt unter der Annahme einer 100%igen Umsetzung mit 2'-Desoxythymidin umgesetzt wird.

30

c) Darstellung von 5'-(2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxythiocarbonyl)thymidin

583 mg 2'-Desoxythymidin wird dreimal mit je 1,5ml absolutem Pyridin koevaporiert, in 5ml absolutem Pyridin
35 aufgenommen und mittels eines Isopropanol/N₂-Bades auf -50°C gekühlt. Eine Lösung von 1g des Thiocarbonylchlorids

in absolutem Methylenchlorid wird langsam zugetropft, die Temperatur darf dabei nicht über -20°C ansteigen. Über Nacht wird bei Raumtemperatur weitergerührt. Eine DC-Kontrolle (Laufmittel Dichlormethan/Methanol = 100:5) zeigt einen deutlichen Produktspot, woraufhin die Reaktion abgebrochen wurde. Zur Aufarbeitung wird der Kolbeninhalt mit 50ml Dichlormethan in einen Schütteltrichter überführt und mit 50ml Aqua dest. gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 50ml Methylenchlorid nachgewaschen, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das bis zur Trockne eingeeengte Rohprodukt wird in Dichlormethan/Methanol (2:1) aufgenommen auf eine Kieselgelsäule aufgetragen, als Laufmittel dient zunächst $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 100:5$, der MeOH-Gradient kann zum Ende der Eluierung auf 100:7 gesteigert werden. Die Reaktion ergab das Produkt in einer Ausbeute von 363mg (30%) als hellbraunes Pulver. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 9:1$) = 0,88

20

Beispiel 2:

5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonyl)thymidin

a) Darstellung von 2-(2-Nitrophenyl)propanol
In einem ausgeheizten und mit Argon befluteten Rundkolben werden 3,02g (2,69ml) 2-Nitroethylbenzol und 600mg Paraformaldehyd in 10ml DMSO vorgelegt und tropfenweise mit einer Lösung von 360mg Kalium-t-Butylat in 4ml t-Butanol versetzt. Nach beendeter Zugabe rührt man 15 Minuten bei Raumtemperatur und erhitzt anschließend für 13/4h auf 70°C . Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wird diese mit EtOAc in einen Schütteltrichter überführt und mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit EtOAc nachgewaschen, die vereinigten organischen

Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel dient Toluol/EtOAc (8:1), der Gradient kann zum Ende der Chromatographie auf 6:1 gesteigert werden. Das Produkt wird erst sehr spät eluiert und schmiert über einen weiten Bereich auf der Säule. Die Reaktion lieferte das Reinprodukt in einer Ausbeute von 2,06g (50%) als rötliches Öl. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel Toluol/EtOAc 8:1) = 0,28

10

b) 2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonylchlorid

In einem ausgeheizten, mit Argon befluteten und mit Septum versehenen Rundkolben werden 754ml Thiophosgen in 15ml absolutem THF vorgelegt und tropfenweise unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,5g des Alkohols und 1,536g (1,115ml) Triethylamin in 15ml THF versetzt. Man rührt eine Stunde unter Eiskühlung sowie eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Die Lösung wird über Celite filtriert und der Filterkuchen mit THF nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand bei -20°C gelagert. Die Reaktion liefert das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 2,09g (97%) als hellbraunes Öl.

15

20

c) Darstellung von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonyl)thymidin

1.48g 2'-Desoxythymidin werden dreimal mit jeweils 15ml absolutem Pyridin koevaporiert, in weiteren 15ml Pyridin aufgenommen und anschließend mittels eines

25

Isopropanol/ N_2 -Kältebades auf -60°C abgekühlt. Eine Lösung von 2,09g Thiocarbonylchlorids in 20 ml absolutem Dichlormethan wird langsam zugespritzt, die Lösung wird zunächst für 6 Stunden bei -60°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Eine DC-Kontrolle (Laufmittel Dichlormethan/Methanol = 9:1) zeigt einen deutlichen Produktspot, woraufhin die Reaktion

30

35

abgebrochen wurde. Zur Aufarbeitung wird der Kolbeninhalt mit 50ml Dichlormethan in einen Schütteltrichter überführt und mit 50ml Aqua dest. gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 50ml Dichlormethan nachgewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in etwas Dichlormethan/Methanol aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Als Laufmittel dient zunächst Dichlormethan/Methanol = 100:1, der MeOH-Gradient kann zum Ende der Eluierung auf 100:4 gesteigert werden. Die Reaktion ergab das Produkt in einer Ausbeute von 937mg (25%) als hellbraunen Schaum. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) = 0,89

15

Beispiel 3: Abspaltung der Schutzgruppe

Zersetzung von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl)thymidin durch Bestrahlung mit UV-Licht

20

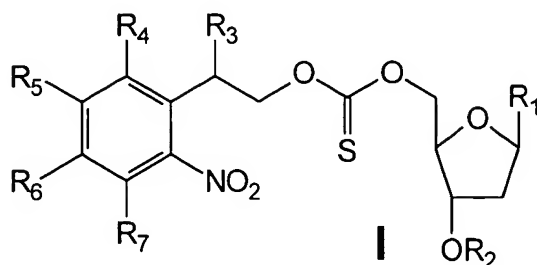
Zur Untersuchung der Zersetzungsgeschwindigkeit von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)-ethoxythiocarbonyl)thymidin wird 1 mg der Verbindung eingewogen, in 1ml Methanol gelöst und in eine Quarzglasküvette (Durchlässigkeit im Wellenlängenbereich von 200nm - 2500nm, Schichtdicke 1cm) gefüllt. Die Bestrahlung erfolgt durch eine Quecksilberdampflampe der Firma ORIEL Instruments, Model 66057 (Leistung 250 W). Um ein übermäßiges Aufheizen der Küvette zu vermeiden, wird ein mit Wasser gefülltes IR-Filter vorgeschaltet. Die Küvette wird in einer Entfernung von etwa 20cm von der Lampenoptik in den Strahlengang gebracht. Im Abstand von je einer halben Minute werden der Lösung 10µl entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Messwerte sind in Figur 1 dargestellt.

35

Patentansprüche

1. Nucleosidderivate der allgemeinen Formel I

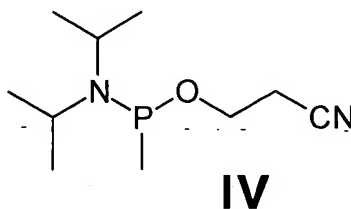
5



worin

10

R_1 eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,
 R_2 ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe der Formel IV



15

bedeutet,

R_3 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist,

20

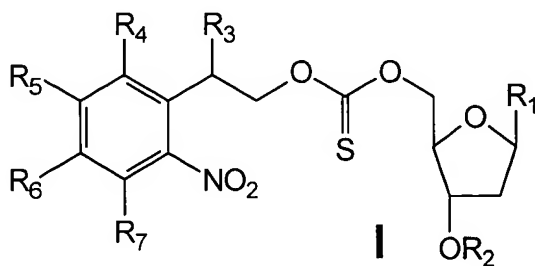
R_4 ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,

R_5 und R_6 unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen,

25

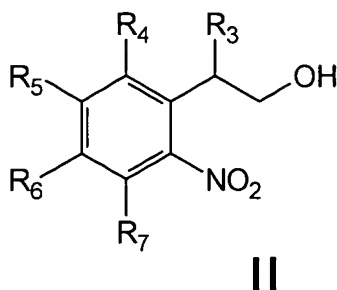
R_7 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist.

2. Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil oder Hypoxanthin ist, welche gegebenenfalls eine Schutzgruppe tragen.
3. Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 ein H-Atom, eine Methyl- oder eine Ethylgruppe ist.
4. Nucleosidderivate gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R_4 ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder eine Methylgruppe ist.
5. Nucleosidderivate gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R_5 und R_6 unabhängig voneinander ein H-Atom oder eine Methyl-, Ethyl-, Methoxy- oder Ethoxygruppe darstellen oder zusammen eine Methylendioxygruppe bilden.
6. Verfahren zur Herstellung eines Nucleosidderivats der allgemeinen Formel I



worin die Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben,

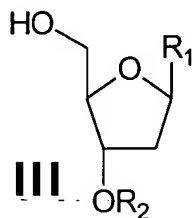
wobei man in an sich bekannter Weise eine Verbindung der allgemeinen Formel II



5

worin die Reste R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 sowie n die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, mit Thiophosgen umgesetzt und die so erhaltenen Thiocarbonylchloride mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III

10



15

worin die Reste R_1 und R_2 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, umgesetzt.

20

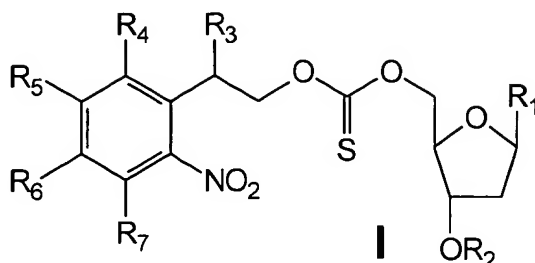
25

7. Verwendung der Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1 zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden.
8. Kit zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden umfassend mindestens ein Nucleosidderivat gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nucleosidderivaten gemäß Anspruch 1 und Reagenz- und Hilfsstoffen sowie Lösemitteln und einer Arbeitsanweisung.

Zusammenfassung

Beschrieben werden neue Nucleosidderivate der allgemeinen

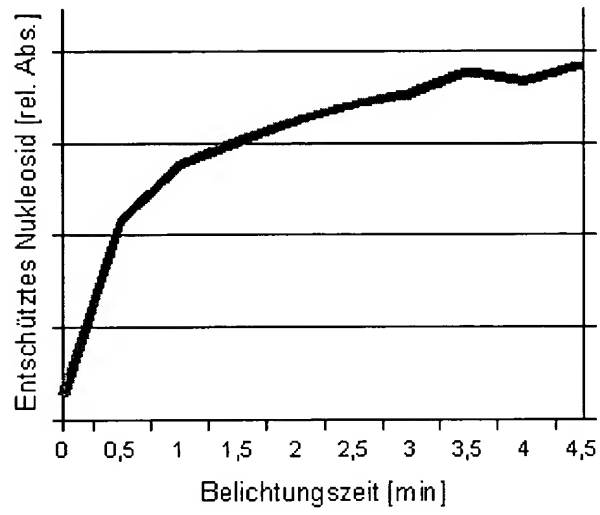
5 Formel I



worin

- 10 R_1 eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,
 R_2 ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe bedeutet,
 R_3 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-
15 Atomen ist,
 R_4 ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,
 R_5 und R_6 unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest
20 mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen und
 R_7 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist.

- 25 Die neuen Nucleosidderivate lassen sich mittels UV-Licht leicht spalten und werden für die Synthese von Oligonucleotiden verwendet.

Fig. 1

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/12642 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 19/06,
19/10, 19/16

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02755

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. August 2000 (10.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 38 092.9 12. August 1999 (12.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
D-10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, D-14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9,
D-10119 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

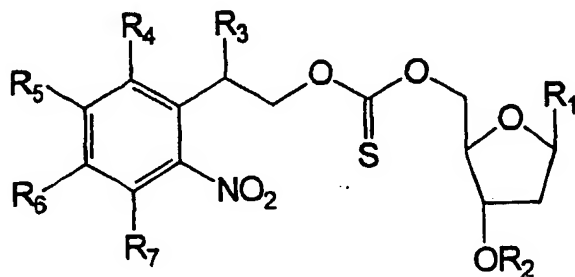
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 7. Juni 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES AND A METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) Bezeichnung: NUCLEOSIDDERIVATE UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG



(I)

(57) Abstract: Disclosed are novel nucleoside derivatives of general formula (I), wherein R₁ represents a nucleobase or a nucleobase that is provided with at least one protective group, R₂ means an H atom or a diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl group, R₃ is an H atom or an alkyl radical with up to 4 C atoms, R₄ represents an H atom, a nitro group or an alkyl radical with up to 4 C atoms, R₅ and R₆, independently from each other, mean an H atom, an alkyl radical with up to 4 C atoms or an alkoxy radical with up to 4 C atoms or together represent a methylenedioxy group and

R₇ is an H atom or an alkyl radical with up to 4 C atoms. The novel nucleoside derivatives can easily be split by means of UV light and are used for the synthesis of oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden neue Nucleosidderivate der allgemeinen Formel (I), worin R₁ eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt, R₂ ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe bedeutet, R₃ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist, R₄ ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt, R₅ und R₆ unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylenedioxygruppe darstellen und R₇ ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist. Die neuen Nucleosidderivate lassen sich mittels UV-Licht leicht spalten und werden für die Synthese von Oligonucleotiden verwendet.

WO 01/12642 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/02755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H19/06 C07H19/10 C07H19/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 10128 A (AFFYMAX TECH NV ;HOLMES CHRISTOPHER P (US); SOLAS DENNIS W (US); K) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application the whole document	1,6,7
A	H. GIEGRICH ET AL.: "New photolabile protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry - synthesis, cleavage mechanisms and applications" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 17, 1998, pages 1987-1996, XP002161670 cited in the application the whole document	1,6,7

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2001

Date of mailing of the international search report

14/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Institutional Application No

PCT/DE 00/02755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410128 A	11-05-1994	AU 5449094 A	24-05-1994

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07H19/06 C07H19/10 C07H19/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 10128 A (AFFYMAX TECH NV ;HOLMES CHRISTOPHER P (US); SOLAS DENNIS W (US); K) 11. Mai 1994 (1994-05-11) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6,7
A	H. GIEGRICH ET AL.: "New photolabile protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry - synthesis, cleavage mechanisms and applications" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 17, 1998, Seiten 1987-1996, XP002161670 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6,7

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

de Nooy, A

INTERNATIONALER RECHT ZUSAMMENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02755

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9410128 A	11-05-1994	AU 5449094 A	24-05-1994

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
)	
KURT BERLIN)	
)	
Serial No.: 10/049,177)	Group Art Unit: Unknown
)	
I.A. Filed: August 10, 2000)	Examiner: Unknown
)	
For: NUCLEOSIDDERIVATE UND)	
VERFAHREN ZU DEREN)	
HERSTELLUNG)	

Box Missing Parts
Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

TRANSMITTAL OF ENGLISH TRANSLATION OF SPECIFICATION

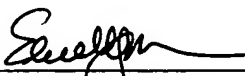
Enclosed herewith please find an English translation of the above-identified application, together with the required fee under 37 CFR 1.17(i). Applicant hereby states that the enclosed translation is accurate and requests that the English translation be used as the copy for examination purposes in the Office.

If there are any fees due in connection with the filing of this paper that are not accounted for, the Examiner is authorized to charge the fees to our Deposit Account No. 11-1755. If a fee is

required for an extension of time under 37 C.F.R. 1.136 that is not accounted for already, such an extension of time is requested and the fee should also be charged to our Deposit Account.

Respectfully submitted,

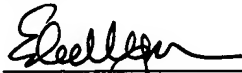
Kriegsman & Kriegsman

By: 

Edward M. Kriegsman
Reg. No. 33,529
665 Franklin Street
Framingham, MA 01702
(508) 879-3500

Dated: May 30, 2002

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box Missing Parts, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on May 30, 2002



Edward M. Kriegsman
Reg. No. 33,529

Dated: May 30, 2002